

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平4-110660

⑮ Int. Cl.<sup>5</sup>

G 01 N 33/53  
33/573

識別記号

D 7906-2 J  
A 9015-2 J

庁内整理番号

⑬ 公開 平成4年(1992)4月13日

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全6頁)

⑭ 発明の名称 肝疾患診断用試薬

⑰ 特 願 平2-230169

⑱ 出 願 平2(1990)8月30日

⑲ 発 明 者 大 久 保 岩 男 滋賀県草津市東矢倉3丁目39番の234号  
⑲ 発 明 者 佐 々 木 實 愛知県名古屋市中区守山区大字吉根字長廻間3241-364  
⑲ 出 願 人 株式会社ミドリ十字 大阪府大阪市中央区今橋1丁目3番3号  
⑲ 代 理 人 弁理士 高 島 一

明細書

1. 発明の名称

肝疾患診断用試薬

2. 特許請求の範囲

キニノーゲン・カルパイン複合体に対する抗体よりなることを特徴する肝疾患診断用試薬。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は肝疾患診断用試薬に関する。

[従来技術・発明が解決しようとする課題]

肝疾患とは、肝細胞の機能障害によって起こる症状を指す。肝疾患は肝細胞の変成、壊死による肝機能の停止ないしは廃絶によって起こることが多いが、肝循環障害が関与することもある。具体的な疾患としては、慢性肝炎、肝硬変、肝癌、A型肝炎、急性肝炎等が挙げられる。これら肝臓疾患の一般的な診断方法としては、種々の肝機能検査が考案されており、それらの検査値が示すところの異常所見の有無によることが多い。現在肝機能検査というべきものの数は200以上にも及んで

いる。代表的なものとしては、(1)胆汁排泄機能：血清ビリルビン値(抱合型、非抱合型)、尿ビリルビン、尿ウロビリノーゲン、尿中胆汁酸など、(2)色素排泄機能：BSP排泄試験、ICGクリアランス試験など、(3)タンパク代謝：血清総蛋白量、血清アルブミン値、血清膠質反応(硫酸亜鉛反応、チモール混濁試験)、A/G比(アルブミン・グロブリン比)、プロトロンビン時間など、(4)糖質代謝：ガラクトース負荷試験、ブドウ糖負荷試験、果糖負荷試験など、(5)脂質代謝：血清コレステロール値(エステル比)、(6)血清酵素：血清アルカリ・フォスファターゼ(ALP)、血清コリンエステラーゼ(Ch-E)、血清トランスアミナーゼ(GOT、GPT)、乳酸脱氢酵素(LDH)、ロイシンアミノペプチダーゼ(LAP)、 $\gamma$ -グルタミールトランスベプチダーゼ( $\gamma$ -GTP)、5'-ヌクレオチダーゼ(5'-N)などが挙げられる。

しかしながら、肝は複雑な機能を有する臓器であり、予備能の大きな臓器でもあるから、ある程度の障害があっても、検査に異常所見が認められ

ないこともある。また、肝疾患の種類によって、障害される機能も異なり、異常を示す検査の項目およびその異常度にも差がみられ、そのため上記諸検査を組み合わせることによって肝疾患の鑑別が行われるのが現状である。

(課題を解決するための手段)

本発明者らは、これらの事情に鑑み各種研究を重ねた結果、キニノーゲン・カルバイン複合体に対する抗体を用いた試薬を調製し、これらが肝疾患診断用試薬として有効であるという全く新しい見知に基づき、本発明の完成に到った。

すなわち、本発明はキニノーゲン・カルバイン複合体に対する抗体よりなることを特徴とする肝疾患診断用試薬に関する。

キニノーゲンとは、血清中に遊離され、血漿 $\alpha_2$ -グロブリン画分中に存在する降圧作用の強いペプチドであるキニンの前駆体で、高分子量および低分子量のものが存在する。キニノーゲンはキニノゲナーゼという酵素で分解されて生理活性型のキニンを生成する。本発明で使用されるキニノー

ゲン・カルバイン複合体に対する抗体を調製するためのキニノーゲンは高分子キニノーゲン、低分子キニノーゲン、あるいはそのH鎖体等が例示される。特にヒト由来、就中ヒト血漿由来のものが好適である。

カルバインはカルシウム依存性プロテアーゼとも呼ばれ、高等動物のほぼすべての臓器の細胞内可溶化画分に存在するチオールプロテアーゼで、ある。その活性の発現には $\text{Ca}^{++}$ を必須とする。本酵素はSH阻害剤やエチレンジアミン四酢酸(EDTA)などで失活するほか、微生物の生産するチオールプロテアーゼ阻害剤、ロイペプチン、アンチパイニン、エボキシコハク酸誘導体のE-64などで強く阻害される。生体内には本酵素を特異的に阻害する蛋白質性のインヒビターも存在し、上記キニノーゲンもまたカルバインの酵素活性を阻害することが知られている。カルバインは分子量約8万および約3万のサブユニットから成り、カルバインIとカルバインIIが存在する。本発明で使用されるキニノーゲン・カルバイン複合体に対する抗体を

調製するためのカルバインとしてはカルバインI、カルバインII等が例示される。特にヒト由来、就中ヒト赤血球由来のものが好適である。

本願発明で使用されるキニノーゲン・カルバイン複合体は、 $\text{Ca}^{++}$ イオン等の二価陽イオンの存在下に結合する複合体である。複合体におけるキニノーゲンとカルバインとのモル比は、通常2:1〜1:2、好ましくは、1:1である。

肝疾患診断は、通常免疫学的分析法によって行われ、たとえばラジオイムノアッセイ(RIA)、酵素抗体法(EIA)、逆受身血球凝集反応(RPHA)などが適用される。

本発明においては、上記のキニノーゲン・カルバイン複合体に対する抗体を用いた肝疾患診断用試薬を提供するものである。

以下、その調製方法を詳述する。

(i) 抗原の調製

抗原としては、キニノーゲン・カルバイン複合体を用いた。

(ii) 抗体の調製

(i)の抗原を用いて抗体を調製した。抗体はポリクローナル抗体、モノクローナル抗体いずれでも可である。本発明に用いられるキニノーゲン・カルバイン複合体に対する抗体(国際キニン学会1987年11月29日〜12月3日で発表)は公知である。抗体調製方法は自明既知の方法で行われる。

モノクローナル法の場合、細胞融合法により抗体を得る。細胞融合法は自明既知の手段にて行われ、その一例は増殖性を持った細胞と目的とする抗体を産生しているリンパ球とをポリエチレングリコールの存在下で反応せしめることにより、増殖性と抗体産生能とを同時に兼ねそなえた細胞を製するもので、この細胞の産生する抗体は一個の抗原決定基に対してのみ反応する単一抗体である。

本発明では増殖性を持つ細胞としてマウスミエローマ細胞を、抗体産生リンパ球として本抗原で免疫されたマウス脾臓細胞(B細胞)を用いて融合させ、さらにスクリーニングして、本抗原のモノクローナル抗体を得る。

ポリクローナル法の場合、抗体は、高度に精製

### 特開平4-110660 (3)

した抗原を動物に免疫し、得られた血清から回収・精製することによって得られる。

当該血清の製造は公知の方法にて行えばよく、例えば高度精製抗原とフロイドの完全アジュバントの混合溶液を作り、動物の皮内に2～3回注射し、最終免疫の数日後採血を行い室温で凝固せしめた後、4℃にて一夜放置し、3,000rpm、20分間の遠心分離より当該抗血清が得られる。

免疫に用いる動物としては、特に動物種を選ぶ必要はなく、例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヤギ、ウマ等が挙げられる。当該抗血清の精製は例えば、J. Am. Chem. Soc., 62, 3386(1940), Fed. Proc., 17, 1161(1958)に記載の方法にて行われる。

#### (iii) 測定試薬の調製

(ii)の抗体を用いて試薬を調製する。キニノーゲン・カルバイン複合体に対する抗体を用いた試薬は、既に公知であり、本発明の試薬もこれに準じて調製される。

具体的には、固定化抗カルバイン抗体、ビオチ

ン化抗キニノーゲン・カルバイン複合体抗体、ペルオキシダーゼ結合アビジン、 $\alpha$ -フェニレンジアミン、過酸化水素からなる測定用キットが例示される。

#### (iv) 測定方法

診断用の試料としては生体内試料、たとえば尿、血液、血漿、血清などが使用される。測定方法は、自体既知の方法によって行われる。

具体的に、酵素免疫分析/サンドイッチ法の場合で説明する。この場合、一次抗体、二次抗体の一方が、抗キニノーゲン・カルバイン複合体抗体であればよい。

##### ① 一次抗体の固定化

一次抗体を担体(ビーズ、マイクロプレート、繊維等)に固定化(0～37℃, 24時間)する。固定化後、適当な溶媒で洗浄し、ブロッキングを行うことが好ましい。

##### ② 試料の添加

キニノーゲン・カルバイン複合体を含む試料を添加し、インキュベーション(10～37℃, 0.1～

5時間)を行う。後に、液相を除去、洗浄することができる。

##### ③ 酵素結合二次抗体の添加

酵素結合二次抗体としてはビオチン化二次抗体と酵素結合アビジンの組合せでもよい。酵素結合二次抗体を添加し、インキュベーション(10～37℃, 0.1～5時間)を行う。後に、液相を除去、洗浄することができる。

##### ④ 基質の添加

基質を添加し、酵素反応(10～37℃, 10～60分間)を行った後に、形成した生成物の吸光度を測定する。

本発明においては、酵素結合二次抗体としてペルオキシダーゼ結合抗体を用い、自体既知の方法、すなわちペルオキシダーゼを結合させた場合、 $\alpha$ -フェニレンジアミンと過酸化水素とを作用させ、主波長492 nm、副波長690 nmの波長にて吸光度を測定することができる。

尚、測定限界はキニノーゲン・カルバイン複合体の場合、100 ng/mlである。

#### (発明の効果)

本発明によって得られた肝疾患診断用試薬は、肝疾患(慢性肝炎、肝硬変、肝臓、A型肝炎、劇症肝炎等)の診断において有用であり、臨床的意義を有するものである。

#### (実施例)

実施例1:キニノーゲン・カルバイン複合体に対する抗体を用いた肝疾患診断試薬

##### (1) 高分子キニノーゲンの精製

高分子キニノーゲンは新鮮なヒト血漿からDEAE-セファデックス及び亜鉛キレート-セファロースを用いたカラムクロマトにより精製した[Biochem., 25, 1669, (1986)]。

##### (2) カルバイン I の精製

カルバイン I はヒト赤血球からDEAE-セルロース、ウルトラゲルAcA 34、ブルーセファロース及びDEAEバイオゲルAを用いたカラムクロマトにより精製した[Biomed. Res., 4, 381, (1983)]。

##### (3) キニノーゲンとカルバインの複合体の形成

複合体を形成するために5 mM塩化カルシウム加

20 mM ホウ酸緩衝液 (PH8) 中、キニノーゲンとカルバインの混合物を1:1 のモル比で30℃、10分間インキュベーションした(N複合体)。さらに1 mM ジサクシニミジルスベレートを加えて室温で30分間インキュベートし[Proc.Natl.Acad.Sci., USA, 81,1679,(1984)]、架橋化複合体 (CL複合体) を得た。

#### (4) 細胞融合と抗体産生

高分子キニノーゲンとカルバインとの架橋化複合体10 $\mu$ gをフロイドの完全アジュバンドで乳化し、Balb/Cマウスに一週間おきに皮下注射した。融合の4日前に、複合体の10 $\mu$ gを生食に溶解して静注した。マウスの脾細胞を回収し、NS-1マウスミエローマ細胞と50%ポリエチレングリコール1500の存在下で融合した [Native, 256, 495, (1975)]。HAT 培地中に生存する陽性ハイブリドーマをエンザイム・リンクド・イムノソルベント・アッセイ (ELISA) 法により同定した。ハイブリドーマはHT (ヒポキサンチン・チミジン) 培地中で限界希釈法によりサブクローン化され、1 $\times 10^7$  細胞

数の接種により1%ヌトリドーマSP加DMEM培地中で3~4日間増殖、成育させた。

尚、DMEM培地には、20 mM グルコース、10 mM N-(2-ヒドロキシエチル) ピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸 (HEPES)、1.14 mM オキサロ酢酸、0.5 mM ビルビン酸ナトリウム、200 unit/  $\ell$  インシュリン、50  $\mu$ M  $\beta$ -メルカプトエタノール、260  $\mu$ M カルベニシリン、170  $\mu$ M ストレプトマイシン、10  $\mu$ M アムホトリシンBを補充してpH 7.2に調整した(cDMEM培地)。HAT感受性培地は上記cDMEM培地に100  $\mu$ M ヒポキサンチン、0.4  $\mu$ M アミノプテリン、16  $\mu$ M チミジン及び15%牛胎児血清を添加したもので、HT培地はそのうちアミノプテリンを含まないものである。

#### (5) 抗体の選別

96ウェルのマイクロタイタープレートの各ウェルをCL複体の20 mM トリス塩酸、pH 7.5 (5  $\mu$ g/  $\mu$ l) 溶液100  $\mu$ lで、室温で2時間コートして、PBS-トウィーン緩衝液で3回洗浄した後、1% BSA でブロックした (室温で1時間処理)。

PBS-トウィーン緩衝液で3回洗浄した後にハイブリドーマ培養上清50  $\mu$ lおよびPBS-TPB 緩衝液を加えて室温で2時間静置した。PBS-トウィーン緩衝液で3回洗浄した後、PBS-TPB 緩衝液で10<sup>4</sup>倍希釈したペルオキシダーゼ結合ヤギ由来抗マウス抗体 (IgA, IgG, 及びIgM) 100  $\mu$ lを加え、室温で2時間放置した。TBS-トウィーン緩衝液で3回洗浄した後に、0.4 mg/  $\mu$ l オルトフェニレンジアミン及び1.82 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>加 0.1M クエン酸-リン酸緩衝液 (pH5) 100  $\mu$ lを遮光下に加えた。酵素反応は2N 硫酸 50  $\mu$ lを加えて10分後に停止させた。各ウェルの生成物の量を492 nmの吸光度で測定した。モノクローナル抗体は1%ヌトリドーマ-SP DMEM培地から50%飽和硫酸分画およびセフアクリルS-300を用いたカラムクロマトにより精製した。

尚、PBSは食塩で等張化した20 mM リン酸緩衝液 (pH7.4)、PBS-トウィーン緩衝液は0.05%トウィーン20加PBS、PBS-TPB 緩衝液は0.05%トウィーン20、2%ポリビニルピロリドン、及び0.2%

牛胎児アルブミン (BSA) 加PBSである。

#### (6) 試薬の調製

血清中の複合体濃度を測定するために、(5)で選別した抗体を用いて、分析系 (サンドイッチELISA) を確立した。この分析系では、アフィニティクロマトにより精製したカルバインI抗体 (ポリクロー抗体) を固相抗体として用い、一次抗体としてビオチン化抗複合体抗体を、そして通常のELISAでの二次抗体の代わりにペルオキシダーゼ結合アビジンを用いた (第1図)。

架橋化高分子キニノーゲン・カルバインI複合体 (CL複合体) 及び非架橋化複合体 (N複合体) の標準曲線を第2図に示す。CL複合体では1 ng/  $\mu$ lまで、N複合体では100 ng/  $\mu$ lまで測定可能であった。

#### (7) 検体の測定

正常人 (13例)、慢性肝炎患者 (17例)、肝硬変患者 (23例)、肝細胞癌 (18例) を用いて血清中のキニノーゲン・カルバイン複合体の濃度を測定した。その結果、正常人に比べて肝疾患患者で

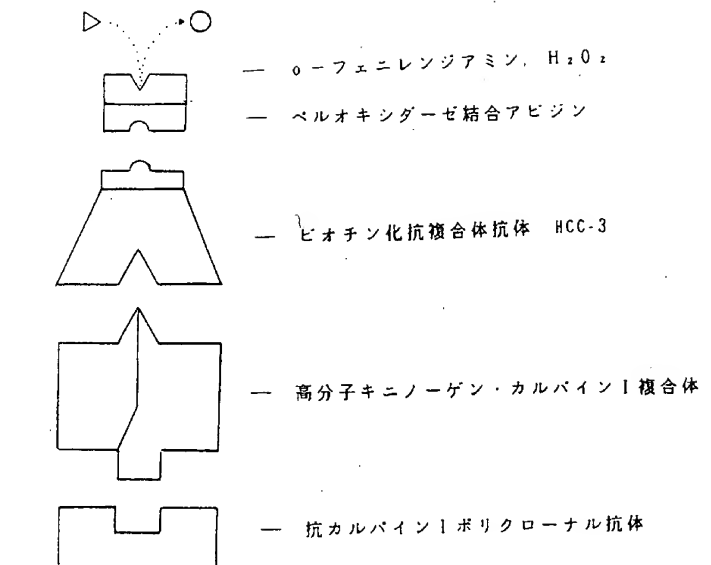
は血清中のキニノーゲン・カルバイン複合体の濃度が有意に高いことが判明した(第3図)。

#### 4. 図面の簡単な説明

第1図は、高分子キニノーゲン・カルバインI複合体の分析系、第2図は、高分子キニノーゲン・カルバインIの架橋化複合体(CL複合体)及び非架橋化複合体(N複合体)の標準曲線、第3図は、正常人と肝疾患患者との血清中のキニノーゲン・カルバイン複合体濃度比較を示す。

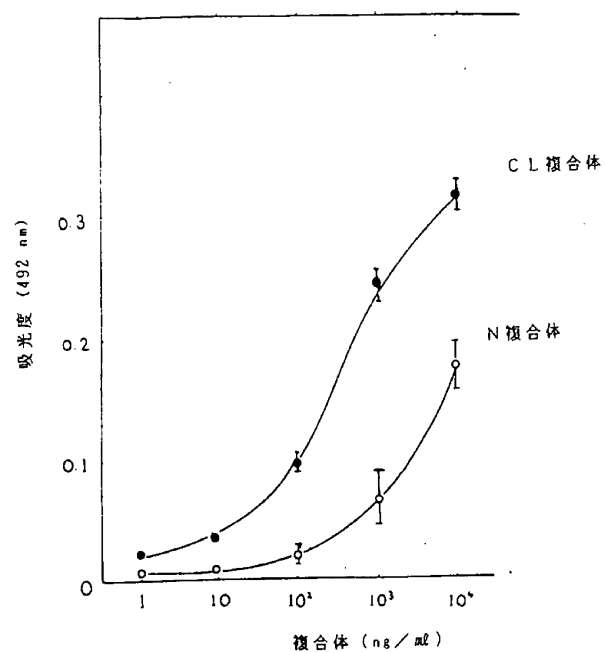
特許出願人 株式会社 ミドリ十字

代理人 弁理士 高島 一



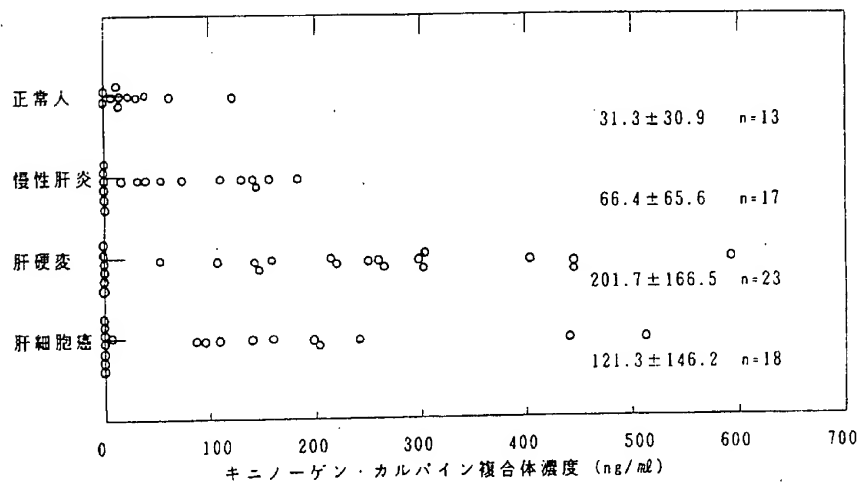
第1図

高分子キニノーゲン・カルバインI複合体の分析系



第 2 図 高分子キニノーゲン・カルバイン I 複合体の標準曲線

C L 複合体 : 高分子キニノーゲン・カルバイン I 架橋化複合体  
 N 複合体 : 高分子キニノーゲン・カルバイン I 非架橋化複合体



第 3 図 正常人と肝疾患患者との血清中のキニノーゲン・カルバイン I 複合体濃度比較